Der Einfluß von Pyritinol auf die freien Nucleotide des Gehirns

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Johannes-Friedrich Brüstle

Saarbrücken

1969

Aus der ABTEILUNG für NEUROCHEMIE (Vorsteher:
Prof. Dr. med. K. Kanig) der NERVENKLINIK der
Universität des Saarlandes

(Direktor: Prof. Dr. med. H.-H. Meyer)

Der Einfluß von Pyritinol auf die freien Nucleotide des Gehirns

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von

Johannes-Friedrich Brüstle
geb. am 6.9.1941 in Bad-Teinach

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
Referent: Prof. Dr. med. K. Kanig

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 26.11.65 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	2
B.	METHODIK	5
	1) Auswahl des Tier- und Gewebematerials	5
	2) Art der Tötung, der Gewebeantnahme und Gewebefixierung	6
	3) Art der Gewebeextraktion	1o
	4) Trennung der Nucleotide	11
	5) Berechnungen	
	a) Nucleotid-Konzentration	14
	b) Statistik	16
C.	PHARMAKOLOGISCHER TEIL DER VERSUCHE	17
	1) Orale Verabreichnung	17
	2) Intraperitoneale Applikation	18
	3) Letaldosis	19
D.	VERSUCHSERGEBNISSE UND DISKUSSION	22
E.	SCHLUSSBETRACHTUNGEN	33
F.	ZUSAMMENFASSUNG	35
G.	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	36
H.	LITERATURVERZEICHNIS	37

A. EINLEITUNG

Das menschliche Gehirn weist einen außerordentlich hohen Energiebedarf auf. Es verbraucht täglich etwa 45o Cal. (ERBSLÖH et al.; E. L. GIGGS et al.); das ist ungefähr ein Viertel des durchschnittlichen Grundumsatzes in Ruhe, obwohl das Gehirngewicht nur etwa 2 % des Körpergewichtes ausmacht.

Mit der Intensität des Atmungsstoffwechsels liegt das Gehirn an der Spitze aller Organe. Sein Sauerstoffverbrauch beträgt 2o - 25 % des Gesamtverbrauchs des Körpers (McILWAIN). Wie aus Untersuchungen zahlreicher Autoren an Tier und Mensch hervorgeht, beträgt der respiratorische Quotient nahezu 1 (R. O. LOEBEL; W. G. LENNOX; H. E. HIMWICH u. L. NAHUM; J. H. QUASTEL; A. G. MULDER u. L. A. CRANDALL; O. EICHHORN). Daraus ergibt sich, daß nur Kohlenhydrate als Energielieferanten in Frage kommen. Aus mehreren Untersuchungen geht hervor, daß unter normalen Bedingungen praktisch der einzige Energielieferant die Glucose ist, von der das Gehirn täglich etwa 115 g verbraucht (J. WORTIS et al.; H. E. HIMWICH; U. GOTTSTEIN et al.). Neben Glucose spielen bei der Hirnernährung andere Substanzen - wie Fructose, Saccharose, Milchsäure, Glutaminsäure, Brenztraubensäure, Bernsteinsäure - physiologischerweise keine Rolle (R. S. HUBBARD u. J. ZOLL; J. WORTIS et al.; J. R. KLEIN u. N. S. OLSEN; E. OPITZ; S.S. KETY).

Da das Gehirn keine nennenswerten organeigenen Energiereserven besitzt, muß ihm ununterbrochen Energie auf dem Blutwege zugeführt werden. Kommt es aus irgendeinem Grunde zu einer verminderten Energiezufuhr, so muß eine Hirnstoffwechselstörung daraus resultieren.

Es erhebt sich nun die Frage, ob Medikamente in der Lage sind, einen gestörten Energiestoffwechsel des Gehirns zu beeinflussen. Diese Fähigkeit wird seit einigen Jahren dem Pyritinol + zugeschrieben.

K. BECKER u. S. HOYER untersuchten den Einfluß von Pyritinol auf den Hirnstoffwechsel an einem gemischten Krankengut und konnten bei Patienten mit einem stark erniedrigten cerebralen Glucoseverbrauch im Laufe der Behandlung einen deutlichen Anstieg des Glucoseverbrauchs und der Glucoseoxydationsrate feststellen. Die Stimulierung des cerebralen Glucoseverbrauchs kann jedoch nicht die einzige Wirkung von Pyritinol sein, denn es soll auch günstig wirken auf Encephalopathien toxischer Genese (z.B. als Folge eines chronischen Alkoholismus), auf akute hirnatrophische Prozesse, auf erethische Idiotie, auf die zentralen Funktionen des Sprachverstehens, auf die psychomotorische Leistungsbereitschaft, auf Folgezustände nach Schädel-Hirntraumen, auf Parkinsonismus, auf Migräne und schließlich auch auf Entwicklungsstörungen im Kindesalter, wie zahlreiche Autoren berichten (D. ADAM u. W. HAMMELMANN; K. G. SCHREIBER; E. W. FÜNFGELD; L. AMBROZI U. I. PRAMER; K. HARTMANN-von MONAKOW; B. LUSTIG; O. EICHHORN u. H. TATZEL; H. ROSENAU; R. HOTOVY et al.; W. SEUFFERT; E. MENGES; M. VODOPIVEC; F. LEMMENS; H. D. PELTZ; K. H. BLECKMANN und noch weitere Autoren).

Eine zentrale Wirkung von Pyritinol läßt sich auch in elektrophysiologischen Untersuchungen nachweisen: Aus Tiefenableitungen (Nucleus amygdalae, Gyrus hippocampi

---

+ Pyritinol (Pyrithioxin, Encephabol (R)).
Die Substanz wurde freundlicherweise von der Fa. E. Merck, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

und vorderer Gyrus cinguli) geht hervor, daß der Hauptangriffspunkt des Pyritinols der Limbische Cortex ist (DIEMATH; SIERRA u. REINOSO-SUAREZ). In dieser Wirkung übertrifft es das Pyridoxol (Vitamin B_6) erheblich (DIEMATH).

Der oxydative Abbau von Glucose führt zur Bildung energiereicher Phosphate, die für die Funktion des Gehirns von ausschlaggebender Bedeutung sind. Es konnte nämlich festgestellt werden, daß zentral erregende oder zentral dämpfende Pharmaka Konzentrationsänderungen der Nucleotide bewirken, die offenbar mit der Funktionsänderung einhergehen (KANIG u. KORANSKY).

Da Pyritinol nach den Untersuchungen von BECKER u. HOYER den Glucoseverbrauch und die Glucoseoxydationsrate steigert, war anzunehmen, daß sich dieser Effekt auch auf den Nucleotidstoffwechsel auswirkt. Gegenstand dieser Arbeit war es daher, die Konzentration der freien Nucleotide des Gehirns unter dem Einfluß von Pyritinol zu untersuchen.

Obwohl Pyritinol seiner chemischen Konstitution nach dem Pyridoxol (Vitamin B_6) nahesteht (s. Abb. 1), besitzt die Substanz weder im mikrobiologischen Test noch im kurativen Mangelversuch an Ratten eine Vitamin-B_6-Wirkung. Pyritinol weist auch keine Antivitamin-B_6-Aktivität auf (KÖRNER u. NOWAK). Dennoch haben wir in unseren Versuchen Pyridoxol in äquimolaren Mengen zu Pyritinol mitgeprüft, zumal das Vitamin auch bei den elektrophysiologischen Untersuchungen als Vergleichssubstanz herangezogen worden war.

B. METHODIK

1) Auswahl des Tier- und Gewebematerials

Welche Tierart eignet sich nun am besten für derartige Untersuchungen des Gehirnstoffwechsels? Ob es zwischen den Spezies größere Unterschiede im Nucleotidgehalt des Gehirns gibt, ist schwer zu beurteilen. Einmal wird von den Untersuchern mit recht unterschiedlichen Methoden gearbeitet, zum andern läßt sich das Gesamtgehirn mit zunehmender Tiergröße immer schwerer fixieren. Vor allem bei den Verbindungen ATP, ADP und AMP kommt es darauf an, standardisierte Versuchsbedingungen einzuhalten. Ohne diese ist es schwierig, aus der Literatur den Nucleotidgehalt des Gehirns zwischen verschiedenen Spezies zu vergleichen.

Bei kleineren Tieren wird meistens das Gesamtgehirn extrahiert, zum Teil werden aber auch nur die Großhirnhemisphären oder sogar nur die Hirnrinde analysiert, wie es bei grösseren Tieren üblich ist.

MANDEL u. HARTH untersuchten den Nucleotidgehalt des Gehirns von Maus, Ratte, Meerschweinchen und Kaninchen und konnten als wesentliches Ergebnis feststellen, daß sich das Verhältnis von Adenosin- zu Guanosin- zu Uridin-Phosphaten bei den Nagern nur wenig unterscheidet.

Da signifikante Unterschiede im Nucleotidgehalt der Gehirne verschieden alter, erwachsener Ratten bestehen (KANIG u. KORANSKY), wurden nur Tiere eines bestimmten Alters (s.u.) verwendet. Ferner konnte KANIG bei seinen Untersuchungen über den Nucleotidgehalt des Rattengehirns feststellen, daß man nur zu gut reproduzierbaren Ergebnissen kommt, wenn man mit einem definierten Inzuchtstamm arbeitet. Diese Bedingung wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eingehalten.

Bei allen Versuchen wurden ausschließlich weibliche Albinoratten vom Stamm Wistar im Alter von 6o (± 1o) Tagen verwendet. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug ca. 165 g. Sie stammten aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover und wurden in Gruppen zu 5 - 1o Tieren in verzinkten Stahlkäfigen mit automatischem Futternachschub, automatischer Wasserzufuhr und automatischer Entfernung der Exkremente gehalten. Ihre Ernährung erfolgte ausschließlich mit dem Mischfutter Altromin (R) der Fa. Altrogge.

2) Art der Tötung, der Gewebeentnahme und Gewebefixierung

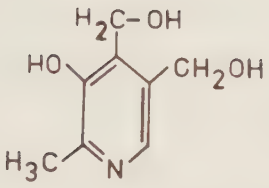
An eine brauchbare Methode der Tiertötung und Gewebeentnahme stellt man zwei Forderungen:

1) Das Gewebe soll möglichst wenig physikalisch gereizt werden, um Erregungen zu vermeiden.
2) Andererseits soll das Gewebe möglichst rasch auf eine Temperatur unter 0° C gebracht werden, um die Stoffwechselprozesse zu stoppen.

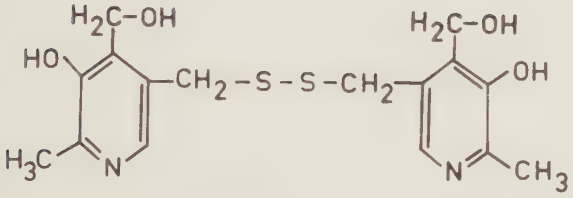
Man kennt im wesentlichen sechs verschiedene Methoden, die alle ihre Vor- und Nachteile haben. Welcher Methode nun der Vorzug zu geben ist, hängt von der Genauigkeit ab, die die Fragestellung erfordert, außerdem davon, welchen Aufwand an Arbeit, Zeit und Material man treiben will und kann (KÄNIG 1963).

Bei Methode I wird dekapitiert und das Gehirn sofort entnommen. Vorteile dieser Methode sind

1) daß sie auch für Stoffwechseluntersuchungen ohne Betäubung der Tiere in Frage kommt;
2) daß sie für die Untersuchung weniger labiler Nucleotide völlig genügt. KÄNIG u. KÖRNER konnten nämlich feststellen, daß die Nucleotide, die keine freie Phosphatgruppe enthalten, z.B. NAD, FAD, UDP-A



Pyridoxol (Pyridoxin, Vit. B_6)



Pyrithioxin (Encephabol®)

Abb. 1

und UDP-G, kaum von der Art der Tötung, der Gewebegewinnung und -fixierung beeinflußt werden;

3) daß sie gewisse technische Erleichterungen bietet gegenüber den Methoden II und III, bei denen der Kopf oder das ganze Tier in flüssigen Stickstoff getaucht wird. Diese Methoden besitzen den Nachteil, daß die Gehirne aus den gefrorenen Schädeln herausgemeißelt werden müssen. Dabei läßt sich ein Miterfassen von Knochensplittern nicht vermeiden. Ein erhöhter Gehalt an Calcium-Ionen führt aber bei der Neutralisation des perchlorsauren Extraktes zu einer teilweisen Ausfällung von Nucleosidphosphaten (KANIG u. KORANSKY). Um dies zu vermeiden, muß daher eine Calciumbestimmung des perchlorsauren Extraktes durchgeführt werden, damit eine äquivalente Menge EDTA hinzugesetzt werden kann. Abgesehen von dem Zeitaufwand entgeht dadurch wertvolles Material der Nucleotidbestimmung. Der EDTA-Zusatz stört ausserdem bei der Ionenaustausch-Chromatographie die Trennung im Bereich der Fraktionen 3c bis 4b (KANIG 1963).

Weitere Methoden (IV bis VI), bei denen das Gehirn in Narkose freigelegt wird, haben den Nachteil, daß durch unvermeidliche leichte mechanische Reizungen des Nervengewebes sowie durch den Operations-Stress sehr leicht Stoffwechselveränderungen herbeigeführt werden können.
Die Vielfalt der Methoden und ihrer Modifizierungen deutet darauf hin, wie schwierig es ist, am Gehirn Stoffwechseluntersuchungen vorzunehmen, da dieses im Vergleich zu anderen Organen (z.B. Leber und Herz) sehr viel schwerer zugänglich ist und wesentlich stärker auf äußere Reize

anspricht. Auf diese Schwierigkeiten stößt man in besonderem Maße, wenn man neben dem normalen Gehirnstoffwechsel auch noch den Einfluß encephalotroper Substanzen auf den Stoffwechsel untersuchen will.

Wenn es darauf ankommt, die in den Fraktionen 3c bis 4b enthaltenen Substanzen (ARPPR, IMP+CDP und UMP) getrennt zu erfassen, empfiehlt sich die Anwendung der Methode I. Die Untersuchung der ARPPR enthaltenden Fraktion 3c ist deshalb besonders interessant, weil die Aktivität der Gehirnnucleosidase, die NAD in NA und ARPPR aufspaltet (COPER, 1961), durch Pharmaka beeinflußt werden kann (COPER, HELGE u. HERKEN; COPER 1963). Die Methode I ist außerdem für Untersuchungen mit zentral dämpfenden Substanzen von Vorteil, weil sich der Effekt auf die energiereichen Phosphate besser erkennen läßt, wenn man durch Reizung des Nervengewebes einen erhöhten Verbrauch an Energiestoffen anregt (KANIG 1963). Bei Untersuchungen mit zentral erregenden Substanzen empfiehlt sich dagegen die Anwendung der Methoden II oder III, um den tatsächlichen Verbrauch an energiereichen Phosphaten besser zu erkennen, der nicht auf die Manipulationen bei der Gewinnung des nervösen Gewebes zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit wählten wir ausschließlich die Methode I (mit flüssigem Stickstoff), da wir einmal alle Nucleotidfraktionen erfassen wollten und da zum anderen das Pyritinol weder zu den zentral erregenden noch zu den zentral dämpfenden Substanzen gerechnet wird. Damit haben wir einen Kompromiß zwischen allen Vor- und Nachteilen angestrebt.

Die Ratten werden in Narkose mit einem eigens dafür gebauten Fallbeil dekapitiert, möglichst in Höhe des ersten Halswirbels. Dann geht man mit einer spitzen Schere durch das Foramen occipitale magnum ein und schneidet mit zwei schnellen Schnitten die Kalotte an beiden Seiten nach vorne auf und klappt sie mittels einer anatomischen Pinzette hoch. Dann schiebt man von der Seite her Gehirn und Medulla oblongata mit der Pinzette vorsichtig in toto heraus, ohne sie zu quetschen, und läßt sie in flüssigen Stickstoff fallen. Vom Beginn der Dekapitation bis zu diesem Moment vergehen nicht mehr als 1o bis 2o sec. Das vollständige Durchfrieren des Gehirns bis auf die Temperatur des Kühlmittels dauert ungefähr 45 sec (KANIG 1963).

Es zeigte sich, daß flüssiger Stickstoff besser ist als flüssige Luft, da in ihm die Gehirne sofort untersinken, während sie in der flüssigen Luft untergetaucht und bewegt werden müssen.

Angaben über Dosis und Applikationsweise der untersuchten Substanzen sowie über den Zeitpunkt der Tötung finden sich bei der Wiedergabe der einzelnen Versuchsergebnisse.

3) Art der Gewebeextraktion

Unter den möglichen Extraktionsverfahren wird hier die saure Extraktion vorgezogen. Einmal werden dadurch Eiweißkörper und Lipoide gefällt, zum andern sind die Nucleotide in Säuren gut löslich. In Frage kommen die Trichloressigsäure- oder die Perchlorsäure-Extraktion. Die Extraktion mit Perchlorsäure hat den Vorteil, daß durch die Neutralisation mit KOH die Säure einfach und schnell quantitativ entfernt werden kann, da sich unlösliches $KClO_4$ bildet.

In der vorliegenden Arbeit extrahierten wir mit Perchlorsäure nach folgendem Verfahren:

Das gefrorene Gewebe wurde grob zerstoßen und in gekühlter Säure homogenisiert und extrahiert.

Die durchgefrorenen Gehirne wurden im mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallmörser mit dem ebenfalls vorgekühlten Pistill zerstoßen, mit gekühlter o,5 n $HClO_4$ (5 ml pro Gehirn) extrahiert und im Ultra-Turrax homogenisiert. Während der anschließenden Zentrifugierung (45 min bei 2o ooo g) in der vorgekühlten Zentrifuge wurde der Rückstand vom Extrakt abgetrennt, das Volumen des Überstandes bestimmt und dieser als Eisbreihomogenat mit 5 n KOH neutralisiert, pH 7 bis 8 (Indikatorpapier). Der Bereich von 7 - 8 wurde gewählt, da unterhalb von pH 5 die Triphosphate gespalten werden, oberhalb von pH 9 das NAD zerstört wird (KANIG 1963).

Während des ganzen Vorganges ist ein wiederholtes Abkühlen notwendig, damit die Temperatur unter 0^{o} C bleibt.

Der neutralisierte Extrakt wurde über Nacht bei 0° C aufbewahrt, weil dabei regelmäßig noch Spuren von $KClO_4$ ausfallen (KANIG 1963). Das Perchlorat wurde kurz abzentrifugiert (5 min bei 3000 U/min) und der Extrakt auf die Säule gegeben. Der Extraktionsrückstand wurde bei 65° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

4) Trennung der Nucleotide

Zur Erfassung der einzelnen Nucleotide benutzten wir das von HURLBERT et al. angegebene Verfahren der Ionenaustausch-Chromatographie. Dieses wurde von KORANSKY sowie von KANIG u. KORANSKY und von KANIG 1963 wesentlich verbessert. Dieses verbesserte Verfahren stimmt auch mit der 1967 von WEGELIN u. MANZOLI angegebenen Methode überein und erlaubt eine sehr gut reproduzierbare Trennung der Nucleotide in 22 Fraktionen in einem Arbeitsgang. Da die Methode mehrfach ausführlich beschrieben wurde, soll hier nur kurz auf sie eingegangen und die inzwischen erfolgten Änderungen beschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Vernetzungsgrad des Austauschers und dessen Korngröße geändert sowie die Umsetzung auf 0,4 n NH_4OOCH in 4 n HCOOH erst nach der ADP-Fraktion vorgenommen (s. Legende Abb. 3).

Als Anionenaustauscher verwendeten wir DOWEX 1 x 8, 100 - 200 mesh, der mit Cl^- als Gegenion geliefert und nach folgender Vorschrift in die Formiat-Form umgeladen wurde:

1) 2 m NH_4OOCH, bis kein Cl^- mehr nachweisbar ist (mit $AgNO_3$)
2) 5 - 1o faches Volumen 6 m HCOOH + 1 m NH_4OOCH
3) 2 - 4 faches Volumen 85%ige HCOOH
4) aqua dest., bis das Eluat neutral ist

Bei der von uns angewandten Gradienten-Elutions-Technik verfährt man so, daß die Elutionsmittel (s. Legende zu Abb. 3) in steigender Konzentration nacheinander in ein Mischgefäß gebracht werden, das magnetisch gerührt wird. Dadurch steigt die Konzentration im Mischgefäß zunächst steil an und nähert sich dann schließlich der Konzentration der zugefügten Lösung. Als Mischer benützten wir durchgehend einen Rundkolben von 25o ml Inhalt. Der Aufbau der Versuchsanordnung erfolgte nach dem Schema von KORANSKY (s. Abb. 2). Wir vereinfachten die darin gezeigte aufwendige Pumpvorrichtung, indem wir zwischen Säure-Vorratsgefäß und Mischkolben lediglich eine Schlauchpumpe schalteten.

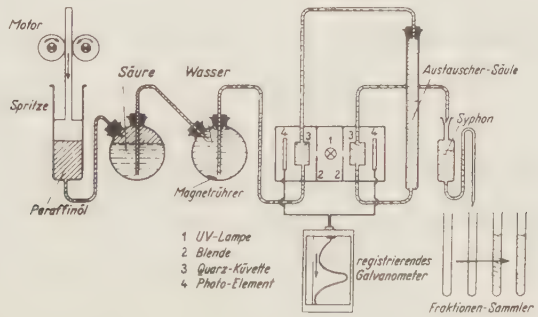


Abb. 2: Schema der Apparatur zur Ionenaustausch-Chromatographie (nach KORANSKY 1958)

5) Berechnungen

a) Nucleotid-Konzentrationen

Bei der Berechnung des Nucleotidgehaltes dient entweder das Frischgewicht als Bezugsgröße oder der bis zur Gewichtskonstanz getrocknete Extraktionsrückstand. Beim Wägen des auf ca. - 18o ^{o} C abgekühlten Hirngewebes läßt es sich nicht vermeiden, daß sich Feuchtigkeit aus der Luft an Gewebe und Zentrifugenbecher niederschlägt. Ferner müssen Schwankungen im Wassergehalt des Gewebes berücksichtigt werden, wenn man vom Frischgewicht ausgeht.

Wir wählten daher als Bezugsgröße für alle Analysenwerte das Gewicht des bei 65 ^{o} C getrockneten Extraktionsrückstandes.

Als Beispiel für die Berechnung geben wir einen Versuch an, bei dem 1o Gehirne aufgearbeitet wurden.

A :	Gewonnener Extrakt	54,o ml
B :	Feuchtrückstand	9,53 g
C :	Gesamthomogenat (A + B)	63,53 g
D :	Trockenrückstand	3,5o g
E :	Gesamtflüssigkeitsvolumen (C minus D)	6o,o3 ml
F :	Flüssigkeit im Feuchtrückstand (B minus D)	6,o3 ml
		= 1o,o4 %

Unter der Annahme, daß alle Flüssigkeit im Feuchtrückstand als lösender Raum vorliegt, verbleibt also ein Substanzrest von 1o,o4 % im Extraktionsrückstand.

Im Perchloratrückstand befindet sich ebenfalls ein Feuchtigkeitsrest. Dieser beträgt im Durchschnitt o,8 ml (KANIG 1963). 0,8 ml vom neutralisierten Extrakt (66,5 ml) entsprechen 1,21 %.

Von den extrahierten 89,96 % gelangen also nur 88,64 % zur Nucleotidbestimmung. Die gefundenen Nucleotidwerte werden daher alle mit dem Faktor 1,128 multipliziert. Bei jedem neuen Versuch wurde der Verlust nach diesem Beispiel berechnet.

Für die Berechnung der Fraktionen (2c) bis (9c/d) gilt die Formel

$$x = \frac{V \cdot E \cdot F}{D \cdot sp.E \cdot 1o^{-3}}$$

Dabei ist

x die Menge des jeweiligen Nucleotids in µMol/g Trockengewicht

V das Volumen der Fraktion in ml

E die Durchschnittsextinktion der Fraktion, gemessen bei einer Wellenlänge von 26o mµ (Spaltbreite ca. o,15 mm)

F der errechnete Verlustfaktor (im Beispiel 1,128)

D das Gewicht des Trockenrückstandes in g

sp.E die spezifische Extinktion des Nucleotids bei 260 mμ

b) Statistik

Zur Prüfung der Frage, ob ein Unterschied statistisch gesichert ist, schlossen wir bei allen Werten, die 10 % und mehr von denen der Kontrolltiere abwichen, eine Wahrscheinlichkeitsrechnung an, da der methodische Fehler ± 5 % ausmacht (KANIG 1967). Wir benutzten dabei die mit der Normalverteilung (Gauss-Verteilung) nahe verwandte Student- oder t-Verteilung.

Dabei beträgt die Standardabweichung (mittlere quadratische Abweichung)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\bar{x} \cdot \sum x)}{n - 1}}$$

Dabei ist $\sum x^2$ die Summe der Quadrate aller Einzelwerte

$\bar{x}$ der arithmetische Mittelwert

n die Anzahl der Versuche

Für den Vergleich zweier Mittelwerte gilt die Formel

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

In den Tabellen der Studentverteilung findet sich bei einem t-Wert von mehr als 1,9 für unsere Versuche eine Irrtumswahrscheinlichkeit p von weniger als o,o5. Dieser Wert wird in der Biologie im allgemeinen als statistisch signifikant angesehen.

C. PHARMAKOLOGISCHER TEIL DER VERSUCHE

Da die bisher in der Literatur niedergelegten Ergebnisse mit Pyritinol teils bei oraler Verabreichung, teils bei intraperitonealer (i.p.) Injektion gewonnen wurden, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit beide Applikationsweisen.

1) Orale Verabreichung

Wir testeten Pyritinol-hydrochlorid (Pyrithioxin, Encephabol (R)) und dessen chemisch nahen Verwandten, das Pyridoxol-hydrochlorid (Pyridoxin-HCl, Vitamin B_6); Formeln siehe Abbildung 1.

Jeweils 1o Tieren je Versuch wurde 14 Tage lang, jeden Tag zu derselben Zeit, das Medikament oral mit einer 7 cm langen Magensonde verabreicht. 1o Kontrolltiere bekamen eine äquivalente Menge Lactose. Am 15. Tag wurden die Tiere mit Pentobarbital-Na (Nembutal (R), 5o mg/ml; 1 ml/kg) i.p. narkotisiert und nach 7o min dekapitiert. Dadurch erhält man dieselbe Narkosedauer wie beim Akutversuch bei einstündiger Einwirkung des Medikaments. Bei obengenannter Dosierung und Applikationsweise von Nembutal (R) tritt die Narkose innerhalb von 4 - 5 min ein und dauert ca. 3 1/2 Stunden an.

Dosierung: Bei allen chronischen Versuchen bleibt die tägliche Dosis dieselbe:

Pyritinol 2oo mg/kg Körpergewicht; MG 459,41
Pyridoxol 18o mg/kg; MG 2o6,69 (äquimolare Menge)
Lactose 6oo mg/kg; MG 342,29 (äquimolare Menge)
(Kontrolltiere).

Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß 5 ml/kg injiziert werden mußten. Die Dosis wurde für jedes Tier gesondert berechnet und nach einer Woche, dem erhöhten Gewicht entsprechend, gesteigert. Versuchsergebnisse siehe Tab. 1.

2) Intraperitoneale Applikation

Pyritinol und Pyridoxol wurden jeweils 1o Tieren i.p. injiziert, nachdem sie sich 1o min in Nembutal-Narkose befanden (vom Beginn der Injektion des Barbiturats an gerechnet). 1o Kontrolltiere (je Versuch) bekamen gleiches Volumen o,9 % NaCl.

Bei allen Versuchen mit Vitamin B_6 (Pyridoxol-HCl) betrug die Dosis 9o mg/kg, als 3,25 proz. Lösung (isoton), die Einwirkungszeit 1 Stunde. Ergebnisse siehe Tabelle 2.

Bei den Versuchen mit Pyritinol veränderten wir Dosis und Einwirkungszeit: die Dosis im Verhältnis 1 : 2, 1 : 4 ... bis 1 : 32, die Zeit im Verhältnis 1 : 2. Der Ausgangswert betrug 1oo mg/kg Pyritinol bei einstündiger Einwirkung (Ergebnisse s. Tab. 2).

Bei der Dosis von 4oo mg/kg verlängerten wir die Einwirkungszeit auf 2 Stunden. Die sich dabei ergebenden Veränderungen sind in Tab. 3 niedergelegt.

Bis zu einer Dosis von 8oo mg/kg (einschließlich) injizierten wir Pyritinol als 6,5-proz. Lösung (isoton, gelöst in H_2O). Bei dieser Dosis beträgt das zu injizierende

Volumen 1,24 ml/1oo g. Um dieses Volumen nicht überschreiten zu müssen, erhöhten wir bei den folgenden Versuchen die Konzentration: 16oo mg/kg Pyritinol wurden als 13-proz., 32oo mg/kg als 26-proz. Lösung injiziert (Ergebnisse s. Tab. 4).

3) Letaldosis

Die Ergebnisse von 5 Versuchen mit insgesamt 5o Tieren, denen 32oo mg/kg Pyritinol i.p. injiziert worden waren, wurden nicht in die Tabelle aufgenommen, da bei dieser Menge die Letaldosis für 6o Tage alte Ratten erreicht war. In 3 Versuchen mit insgesamt 3o Tieren starben nämlich 85 % der Tiere innerhalb von 6o min., die restlichen 15 % innerhalb von 7o min. nach Verabreichung des Medikaments.

Zwei weitere Versuche (2o Ratten) wurden von 19 Tieren überlebt. Allerdings waren diese durchschnittlich 2o Tage älter und lassen sich daher nicht mit denen aus den bisherigen Versuchen vergleichen.

Mit der Dosis von 16oo mg/kg Pyritinol liegt man eindeutig im subletalen Bereich. In 6 Versuchen mit 6o Tieren (6o $\pm$ 1o Tage alt) starben 5 Tiere innerhalb einer Stunde. Es stellte sich heraus, daß es vorwiegend die jüngeren Ratten waren, die den Versuch nicht überlebten. Beim Vergleich der einzelnen Nucleotidkonzentrationen miteinander nach i.p. Injektion von 1oo mg/kg und von 16oo mg/kg Pyritinol ergeben sich signifikante Unterschiede (s. Tab. 4).

Ein Herantasten an die Letaldosis bei i.p. Applikation war deswegen notwendig, weil Angaben darüber von seiten der Herstellerfirma nur für die orale, die subcutane und die intravenöse Applikationsweise vorlagen. Wie zu erwarten war, lag die Letaldosis bei i.p. Applikation zwischen der bei i.v. und derjenigen bei s.c. Applikation.

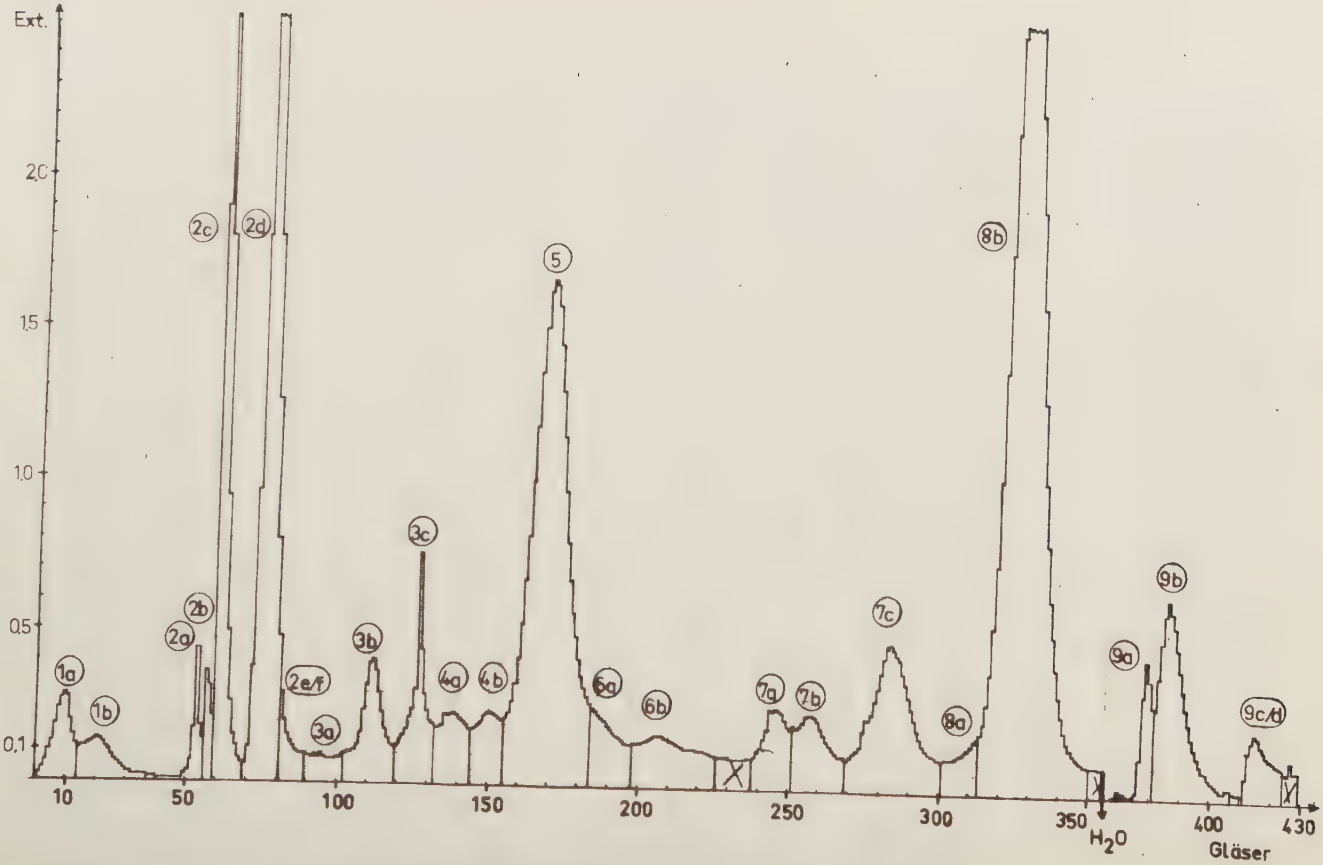


Abb. 3 Jonenaustausch-Chromatogramm eines Extraktes aus 10 Rattengehirnen

Zusammensetzung der Fraktionen:

Fr. 1: Adenin, Adenosin, freies Nicotinsäureamid
Fr. 2a: Uridin und Harnsäure, Fr. 2b: CDP - Cholin, Fr. 2c: NAD, (CMP)
Fr. 2d: AMP, Fr. 2e/f: 3 -5 AMP
Fr. 3a: NAD, Fr. 3b: GMP, Fr. 3c: ARPPR
Fr. 4a: IMP, CDP, Fr. 4b: UMP
Fr. 5: ADP, Fr. 6 a/b: Flavin-Nucleotide
Fr. 7a: UDPA, Fr. 7b: UDPG, Fr. 7c: GDP
Fr. 8a: CTP, Fr. 8b: ATP, (UDP)
Fr. 9a: UTP, Fr. 9b: GTP, Fr. 9c/d: Gs-x

Elutionsmittel: Glas Nr. 8 - 38 H_2O
Nr. 39 - 69 : 1 n HCOOH
Nr. 7o- 184 : o,2 n NH_4OOCH in 4 n HCOOH
Nr. 185-263 : o,4 n NH_4OOCH in 4 n HCOOH
Nr. 369-4o7 : Vorratsgefäß 2 n NH_4OOCH, Mischer 1 n NH_4OOCH
Nr. 4o8-429 : ohne Mischer 1 n NH_4OOCH in 4 n HCOOH

D. VERSUCHSERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 4 aufgeführt. Da die gefundenen Konzentrationsänderungen einzelner Nucleotide im Folgenden eingehend diskutiert werden, kann auf eine gesonderte Beschreibung der Ergebnisse verzichtet werden.

Es ist zunächst notwendig, sich über die mannigfaltigen Reaktionsmöglichkeiten der Nucleotide klar zu werden. Die Nucleotide erfüllen zwei Aufgaben:

1) Sie sind als Cofaktoren an einer Fülle von gruppenübertragenden Reaktionen beteiligt;
2) Sie stellen das Sammelbecken ("pool") für den Nucleinsäure-Stoffwechsel dar.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cofaktoren sowie ihre übertragbaren Gruppen und ihre nahe Beziehung zu Vitaminen sind in Tab. 5 wiedergegeben.

In der Reihe der wasserstoffübertragenden Coenzyme treten weder unter Pyritinol- noch unter Pyridoxol-Einfluß signifikante Änderungen auf, wie man aus dem Vergleich der Tabellen 1 bis 4 ersehen kann.

Wie liegen nun die Verhältnisse bei den gruppenübertragenden Coenzymen? Hier sind an erster Stelle die Adenin-Nucleotide zu nennen. Vergleicht man in Tab. 1 die Werte von AMP, ADP und ATP mit denen der Kontrollen, so zeigen sich noch keine Veränderungen, die deutlich außerhalb der Streubreite liegen. Die oral verabreichten Dosen von Pyritinol und Pyridoxol sind offensichtlich zu niedrig. Dasselbe gilt für die i.p. injizierten Dosen in Tab. 2. Da sich in Tab. 1 und 2 die Werte unter Pyritinol und unter Pyridoxol weder bei oraler noch bei i.p. Applikation voneinander unterschieden, beschränkten wir uns, wegen des

Subst.	Anz. der Vers.	AMP	ADP	ATP	AMP +ADP +ATP	GMP	GDP	GTP	GMP +GDP +GTP	UMP	UDPA	UDPG	UTP	UMP +UDP +UTP	ARPPR	IMP CDP	Fla-vin-Nucl.	CTP	NAD	$\sum$ Nucl.
I	5	3,41	3,18	3,47	1o,o6	o,52 σ o,17	1,37	o,73 σ o,28	2,62	o,57	o,5o	o,63	o,25	1,95	o,41	o,63 σ o,41	o,99	o,15	1,25	18,42
II	5	3,6o	2,94	3,45	9,99	o,51 σ o,12	1,35	o,51^{+} σ o,12	2,37	o,52	o,5o	o,68	o,3o	2,oo	o,4o	o,59	o,97	o,17	1,15	17,92
III	5	3,75	3,21	3,67	1o,63	o,46^{+} σ o,17	1,38	o,62^{+} σ o,14	2,46	o,53	o,49	o,58	o,27	1,88	o,41	o,55^{+} σ o,1o	o,91	o,14	1,17	18,47

Substanz I: Lactose, 6oo mg/kg, Kontrolltiere
Substanz II: Pyritinol · HCl 2oo mg/kg
Substanz III: Pyridoxol · HCl 18o mg/kg

Alle Angaben in µMol/g Trockengewicht
Werte mit $^{+}$: $p > o,o5$
Anzahl der Tiere : jeweils 5o (pro Vers. 1o)

Alle Substanzen wurden über 14 Tage täglich oral mit einer Sonde verabreicht

TABELLE 1

Subst.	Anz. der Vers.	AMP	ADP	ATP	AMP +ADP +ATP	GMP	GDP	GTP	GMP +GDP +GTP	UMP	UDPA	UDPG	UTP	UMP +UDP +UTP	ARPPR	IMP CDP	Flavin-Nucl.	CMP	NAD	Σ NUCL.
I	4	3,34	3,63	4,02	11,04	0,55	1,40	0,59	2,54	0,57 ±0,03	0,46 ±0,03	0,63	0,30	1,96	0,39 ±0,08	0,63	0,93	0,10	1,04	19,14
II	4	3,11	3,51	4,14	10,77	0,50	1,45	0,65	2,60	0,48 ±0,05	0,52+ ±0,06	0,62	0,29	1,91	0,43+ ±0,11	0,58	0,95	0,16	1,15	19,99
III	4	3,40	3,57	4,08	11,05	0,53	1,40	0,64	2,58	0,56 ±0,11	0,52+	0,62	0,29	2,00	0,40	0,59	0,96	0,14	1,07	19,24

Substanz I: 0,9 % NaCl, Kontrolltiere

Substanz II: Pyritinol · HCl 100 mg/kg

Substanz III: Pyridoxol · HCl 90 mg/kg

Einwirkungszeit der Subst. I bis III jeweils 1 Stunde

Alle Substanzen wurden i.p. injiziert

Alle Angaben in µMol/g Trockengewicht

Werte mit + : $p > 0,05$

Anzahl der Tiere: jeweils 10 (pro Vers. 10)

TABELLE 2

	Anz. der Vers.	ATP	ADP	ATP	AMP +ADP +ATP	GMP	GDP	GTP	GMP +CDP +GTP	UMP	UDPA	UDPG	UTP	UMP +UDP +UTP	ARPPR	IMP CDP	Fla- vin- Nucl.	CTP	NAD	NUCL Σ
100mg/kg EZ 1	4	3,11 ±0,77	3,51	4,14 ±0,89	10,77	0,50 ±0,06	1,45	0,65	2,60	0,48 ±0,05	0,52	0,62	0,29 ±0,11	1,91	0,43	0,58	0,95	0,16	0,15	13,99
200mg/kg EZ 1	1	3,49	3,66	4,08	11,23	0,50	1,48	(0,49)	(2,5)	0,52	0,54	0,58	(0,20)	1,84	0,66	0,63	(0,51)	0,13	0,33	(18,58)
400mg/kg	1	2,96	3,33	4,29	10,57	0,50	1,43	0,82	2,75	0,51	0,53	0,69	0,31	2,05	0,41	0,59	1,30	0,16	1,16	19,43
400mg/kg EZ 2	3	++ 4,25 ±0,22	3,21	++ 2,85 ±0,32	10,31	++ 0,69 ±0,06	1,58	0,59	2,86	++ 0,69 ±0,06	0,51	0,62	++ 0,17 ±0,03	1,99	0,40	0,63	1,37	0,18	1,10	19,18

Pyritinol, i.p. injiziert, Dosis s. Tab.

EZ: Einwirkungszeit des Medikaments in Stunden

Anzahl der Tiere: pro Versuch 10

Alle Angaben in µMol/g Trockengewicht

Werte mit ++ : $p < 0,05$ (signifikant)

TABELLE 3

Dosis mg/kg	Anz. der Vers.	AMP	ADP	ATP	AMP +ADP +ATP	GMP	GDP	GTP	+GMP +GDP +GTP	UMP	UDPA	UDPG	UTP	UMP +UDP +UTP	APPPP	INP CDP	Fla-vin-Nucl.	CTP	NAD	Σ Nucl.
100	4	3,11 ±0,77	3,51	4,14 ±0,89	10,77	0,50	1,45	0,65	2,60	0,48 ±0,05	0,52	0,62	0,29 ±0,10	1,91	0,43	0,58	0,95	0,16	1,15	18,99
200	1	3,49	3,66	4,08	11,23	0,50	1,48	(0,49	2,47)	0,52	0,54	0,58	(0,20	1,84)	0,66	0,63	(0,51)	0,13	0,83	(18,58)
400	1	2,96	3,33	4,29	10,57	0,50	1,43	0,82	2,75	0,51	0,53	0,69	0,31	2,05	0,41	0,53	1,30	0,16	1,16	19,43
800	1	3,75	3,42	3,54	10,71	0,52	1,55	0,70	2,77	0,51	0,44	0,54	0,20	1,69	0,44	0,56	1,00	0,11	1,09	18,58
1600	6	+ 4,18 ±0,63	3,40	++ 3,28 ±0,28	10,86	0,55	1,60	0,61	2,76	+ 0,55 ±0,07	0,56	0,67	+ 0,20 ±0,02	1,98	0,46	0,60	1,04	0,18	1,24	19,48

Pyritinol, i.p. injiziert, Einwirkungszeit jeweils 1 Std.
Anzahl der Tiere: pro Versuch 10

Alle Angaben in µMol/g Trockengewicht
Werte mit $^{+}$: $p > 0,05$
Werte mit $^{++}$: $p < 0,05$ (signifikant)

TABELLE 4

Coenzym	Abkürzung	Übertragene Gruppe	Zugehöriges Vitamin
I. Wasserstoffübertragende Coenzyme			
Nicotinamid-adenin-dinucleotid (= Diphospho-pyridin-nucleotid	NAD^+ DPN^+)	Wasserstoff	Nicotinamid
Flavin-mononucleotid	FMP	Wasserstoff	Riboflavin
Flavin-adenin-dinucleotid	FAD	Wasserstoff	Riboflavin
II. Gruppenübertragende Coenzyme			
Adenosintriphosphat	ATP	Phosphat, Pyrophosphat, AMP und Adenosin	--
Uridindiphosphat	UDP	Zucker und Uronsäuren	--
Cytidindiphosphat	CDP	Phosphorylcholin u. verwandte Gruppen	--

TABELLE 5 (in Anlehnung an KARLSON)

großen methodischen Aufwandes, bei den weiteren Versuchen auf die Untersuchung von Pyritinol.

Vergleicht man nun aber in Tab. 3 die Adenosinphosphat-Werte der mit 1oo mg/kg Pyritinol (Einwirkungszeit 1 Std.) behandelten Ratten mit den Werten der mit 4oo mg/kg Pyritinol (Einwirkungszeit 2 Std.) behandelten Tiere, so zeigt sich eine statistisch gesicherte ATP-Abnahme und AMP-Zunahme. Beide Größen liegen im Bereich von 1 µMol/g Trockengewicht. Das ADP zeigt dabei eine geringe, nicht signifikante Erniedrigung um o,3 µMol/g.

Welche Reaktionen können nun für die gefundenen Verschiebungen verantwortlich sein? Zur Beantwortung dieser Frage sollen zunächst die Reaktionsmöglichkeiten des ATP besprochen werden. Dank seinem hohen Gruppenübertragungspotential vermag ATP verschiedene Reste zu übertragen. Je nachdem, welche Bindung reagiert, kommt es zur

1) Abspaltung von ADP, Übertragung des Orthophosphat-Restes,
2) Abspaltung von AMP, Übertragung des Pyrophosphat-Restes,
3) Abspaltung von Pyrophosphat, Übertragung des Adenosinmonophosphat-Restes,
4) Abspaltung von Ortho- und Pyrophosphat, Übertragung des Adenosylrestes.

Da die unter 1) genannte Reaktion von den angegebenen Reaktionsmöglichkeiten die häufigste ist, könnte die ATP-Abnahme auf eine Förderung endergonischer Reaktionen schließen lassen. In erster Linie ist dabei an die direkte Phosphorylierung der freien Glucose in 6-Stellung zu denken, die durch die Transphosphorylase Hexokinase erfolgt. Dabei wird ATP verbraucht unter Entstehung von ADP. Glucose-6-Phosphat (Robison-Ester) ist ganz allgemein

die stoffwechselaktive Form der Glucose und damit Ausgangspunkt des aeroben und anaeroben Abbaus der Kohlenhydrate im Organismus (s. auch weiter unten).

Diese Hypothese einer vermehrten direkten Phosphorylierung der freien Glucose würde sich auch mit den bisher in der Literatur niedergelegten Ergebnissen vereinbaren lassen. Auf die entsprechenden Versuche von BECKER u. HOYER an 11 Patienten im Alter zwischen 25 und 62 Jahren sind wir in der Einleitung schon eingegangen. Demnach deuten klinische und biochemische Befunde auf eine Förderung der Glucose-Utilisation durch Pyritinol.

QUADBECK et al. untersuchten das Verhalten des Phosphat-, Natrium- und Glucosetransportes durch die Blut-Hirnschranke unter dem Einfluß von Pyritinol an Ratten bzw. Mäusen. Dabei ergab sich eine bereits nach einmaliger Gabe von Pyritinol auftretende Steigerung des Glucosetransportes, die nach Behandlung über einen längeren Zeitraum besonders ausgeprägt war. Diese Befunde konnten jedoch von SEILER et al. mit anderen Methoden nicht bestätigt werden.

Wäre nun eine vermehrte direkte Phosphorylierung der freien Glucose die einzige Wirkung, so müßte man nicht eine Abnahme, sondern eher eine Zunahme des ATP feststellen, da bei den weiteren Abbauschritten ja Energie frei wird, die zum Teil in Form von ATP als chemische Energie erhalten bleibt. Diese wird in erhöhtem Maße bei Erregung des Gehirns in Anspruch genommen.

Als weitere Reaktion mit Übertragung der terminalen Phosphatgruppe kommt die Synthese von Kreatinphosphat in Frage, die durch eine Kinase nach der Gleichung

$$\text{Kreatin} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Kreatinphosphat} + \text{ADP}$$

katalysiert wird. Kreatinphosphat spielt im Gehirn neben ATP als Energiespeicher eine Rolle. Es liefert bei der Hydrolyse dieselbe Menge freier Energie (ca. 8 Cal/Mol) wie ATP, wenn dieses zu AMP + Pyrophosphat zerfällt.

Daß die ATP-Verbindung nicht von einer Vermehrung des ADP, sondern des AMP begleitet ist, spricht nicht gegen eine Orthophosphat-Übertragung als bestimmende Reaktion, da ADP durch Katalyse von Myokinase nach der Gleichung

$$2\ \text{ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$$

reagieren kann.

Ferner ließen sich die chemischen Befunde erklären durch Beschleunigung von Reaktionen nach dem Typ 2), bei denen eine Übertragung des Pyrophosphat-Restes unter Abspaltung von AMP stattfindet. Ein Beispiel ist die Überführung von Ribose-5-phosphat in 5-Phosphoribose-1-pyrophosphat. Man hätte damit gleichzeitig eine Erklärung für die Vermehrung von AMP als auch für die Verminderung von ATP. Jedoch wird die Übertragung von Pyrophosphat als vergleichsweise selten angesehen.

Die unter 3) genannte Übertragung von AMP unter Abspaltung von Pyrophosphat ist wiederum häufig. Bei dieser Art von Reaktion entsteht meist eine Verbindung hohen Gruppenübertragungspotentials, eine "aktivierte Verbindung". Hierher gehört zum Beispiel die Aminosäureaktivierung, die der Proteinsynthese vorausgeht. Die chemische Energie wird vom ATP geliefert, das unter Abspaltung von Pyrophosphat mit der Säuregruppe der Aminosäure ein Carbonsäure-phosphorsäure-anhydrid bildet. Bereits bei dem nächsten Schritt, der Transferierung des Aminosäurerestes an die RNS, wird AMP wieder frei. Damit hätte man natürlich eine Erklärung für die Abnahme des ATP bei gleichzeitiger Zunahme von AMP, doch müßte die Annahme einer erhöhten Aminosäureak-

tivierung unter Pyritinol durch gesonderte Untersuchungen geprüft werden.

Die unter 4) genannte Reaktion, die Übertragung des Adenosylrestes, spielt bei der Aktivierung der Methylgruppe eine Rolle. Das "aktive Methyl" ist das Adenosylmethionin, das z.B. mit der Guanidino-essigsäure reagieren kann unter Bildung von Adenosylhomocystein + Kreatin. Von Bedeutung ist ferner Adenosylmethionin bei der Synthese von Cholin-haltigen Lipoiden, z.B. Lecithin und Sphingomyelin. Die Bildung aller dieser Substanzen schließt einen ATP-Verbrauch ein.

Das ATP ist bekanntlich nicht das einzige reaktionsfähige Triphosphat. Andere Basen wie Guanin, Cytosin und Uracil können anstelle des Adenins eintreten. Zwei bekannte Beispiele hierfür sind das Uridylsäure-System im Kohlenhydrat-Transfer und das Cytidylsäure-System bei der Phosphatid-synthese. Wie Tab. 3 zeigt, sind GMP und UMP unter hohen Dosen Pyritinol mit Sicherheit erhöht, GTP und UTP dagegen erniedrigt. Die Erniedrigung von GTP läßt sich statistisch zwar nicht sichern, doch ist sie sehr deutlich. Die Diphosphate GDP, UDPA und UDPG bleiben dabei konstant.

Diese Befunde stimmen mit obigen Befunden über die Adenosinphosphate überein. Auch hier zeigt sich ein erhöhter Verbrauch an energiereichen Phosphaten unter zweistündiger Einwirkung von Pyritinol. Welche Reaktionen kommen hierfür in Betracht?
Im Falle des Uridins sind folgende Reaktionsmöglichkeiten in Erwägung zu ziehen:

1) Das aktivierte Glucosemolekül reagiert enzymatisch mit UTP zur Uridindiphosphat-glucose nach der Gleichung:
UTP + Glucose-1-phosphat ⟶ UDPG + Pyrophosphat

2) Der gleiche Reaktionsmechanismus gilt für N-Acetyl-glucosamin-phosphat.

Beide aktivierten Zuckerverbindungen dienen dem Einbau der entsprechenden Zucker in Polysaccharide, Cerebroside und Ganglioside.

Eine Abnahme von UTP (bei gleichbleibenden UDPG- und UDPA-Werten) könnte erstens dafür sprechen, daß ein erhöhter Einbau dieser Zuckerverbindungen in die genannten höher strukturierten Verbindungen stattgefunden hat, oder zum anderen dafür, daß bei erniedrigtem ATP (siehe oben) das freiwerdende UDP nicht ausreichend phosphoryliert werden kann. Für die zuerst genannte Ansicht sprechen auch die orientierenden Untersuchungen von QUADBECK et al., die nach Applikation von ^{14}C-markierter Glucose eine Zunahme der Aktivität unter Pyritinol in erster Linie in der Lipoidfraktion gefunden hatten.

Bei den Cytidinverbindungen lassen sich keine signifikanten Änderungen erkennen. Das mag einmal an den geringen Konzentrationen, zum andern an der ungenügenden Abtrennung von den benachbarten großen Adenosinfraktionen liegen.

Vergleicht man in Tabelle 4 die Versuche 1oo mg/kg Pyritinol mit 16oomg/kg Pyritinol, so kommt man für alle freien Nucleotide des Gehirns grundsätzlich zu denselben, bislang beschriebenen Ergebnissen. Die Einwirkungszeit betrug in beiden Versuchen jeweils eine Stunde. Man ersieht daraus, daß es bei dieser Zeit schon subletaler Dosen bedarf, um denselben Effekt wie in Tabelle 3 (4oo mg/kg) bei der doppelten Einwirkungszeit zu erzielen.

D. [illegible]

Abschließend können wir feststellen, daß die in der vorliegenden Arbeit gefundene, statistisch signifikante Abnahme der Nucleosid-Triphosphate durch hohe Dosen Pyritinol mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen erhöhten Energieverbrauch zurückzuführen ist, wie man sie z.B. bei zentraler Stimulation findet.
Auch wenn dieser Effekt erst bei einer Dosierung auftritt, die weit über der therapeutischen liegt, läßt sich doch die Wirkungsrichtung des Medikaments erkennen.

Unsere Ergebnisse vertragen sich auch mit den Aussagen anderer Autoren. QUADBECK et al. fanden eine Steigerung des Natriumtransportes durch die Blut-Hirnschranke unter dem Einfluß von Pyritinol. Daraus schlossen die Verfasser, daß Pyritinol "sicher keine sedative, sondern eher eine zentral stimulierende Wirkung entfaltet".

Für einen stimulierenden Effekt sprechen auch die Untersuchungen von HOTOVY et al. sowie von KRAFT, nach denen eine Anhebung der psychomotorischen Leistungsbereitschaft festzustellen war, insbesondere nach Senkung der Leistungsfähigkeit der Personen durch α-Monobromisovaleryl-carbamid vor dem Versuch.

Aus dem klinischen Anwendungsbereich ergeben sich mehrere Hinweise auf eine stimulierende Wirkung von Pyritinol: Bei erethischen Kindern, besonders nach Gaben zu hoher Dosen, kann es bisweilen zu einer unerwünschten Antriebssteigerung kommen. Darüber hinaus soll man den Kindern die letzte Tagesgabe nicht am späten Nachmittag oder Abend verabreichen, um Schlafstörungen zu vermeiden (Literatur Nr. 56).

Sehr günstige Ergebnisse im Sinne einer Antriebssteigerung

konnten ferner bei einigen Fällen von Parkinsonismus erzielt werden (FÜNFGELD; H.-v.MONAKOW; MENGES; SEIFERT). Hier verbesserten sich vor allem die Sprachstörungen und die Akinese, während Rigor und Tremor nur wenig beeinflußt wurden.

Im Katalepsie-Test an Ratten führte eine vierzehntägige Vorbehandlung mit Pyritinol zu einer Abschwächung des kataleptischen Zustandes (SOMMER).

Sucht man nach einer einheitlichen Erklärung all dieser Befunde, so bietet sich dafür als Modell das extrapyramidal-motorische System an. Man muß sich nach den bisherigen klinischen und tierexperimentellen Erkenntnissen seine normale Funktion so vorstellen, daß ein Gleichgewicht zwischen adrenergischen und cholinergischen Mechanismen besteht (KANIG 1961). Katalepsie (bei der Ratte) und Parkinsonismus (beim Menschen) sind dann zu erwarten, wenn cholinergische Mechanismen überwiegen. Eine Wiederherstellung des Gleichgewichts läßt sich durch anticholinergisch oder durch adrenergisch wirkende Substanzen erreichen (KANIG 1962). Ob der Pyritinol-Effekt im Sinne einer anticholinergischen oder einer adrenergischen Wirkung zu erklären ist, müßten weitere pharmakologische Untersuchungen klären. Es kann vorläufig nur so viel gesagt werden, daß es zu einer anderen Einstellung dieses Gleichgewichts in Richtung auf die adrenergische Wirkung kommt.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Der Autor behandelt die Frage, ob die klinisch erprobte cerebrale Leistungsentfaltung unter Pyritinol (Encephabol®) auf einer Energieerhaltung und -vermehrung innerhalb des Hirnstoffwechsels beruht. Dabei untersuchte er die Gehirne von 450 Albinoratten auf ihren Gehalt an freien Nucleotiden. Die sehr gut reproduzierbare Trennung der Nucleotide in 22 Fraktionen erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie in Gradienten-Elutions-Technik. Unter oral und i.p. verabreichten therapeutischen Dosen von Pyritinol ließen sich keine signifikanten Änderungen im Nucleotidgehalt erkennen. Das gleiche ergab sich mit äquimolaren Mengen von Pyridoxol. Erst bei einer Dosis von 400 mg/kg Pyritinol und einer Einwirkungszeit von 2 Std. nach i.p. Applikation ließ sich eine statistisch signifikante Abnahme der energiereichen Phosphate, bei gleichzeitiger Zunahme der Monophosphate, feststellen. Gleiche Veränderungen erbrachte ein Versuch mit der subletalen Dosis von 1600 mg/kg Pyritinol i.p. bei einstündiger Einwirkung.

Diese Ergebnisse lassen sich im Zusammenhang mit anderen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen dahingehend deuten, daß durch Pyritinol der Energieverbrauch des Gehirns erhöht wird, wie man es auch bei zentraler Stimulation findet.

G. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ARPPR	Adenosin-5'-diphosphatribose
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Cal	Kilokalorien
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
Gs-x	noch ungeklärte Guanosin-Fraktion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IMP	Inosin-5'-monophosphat
MG	Molekulargewicht
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
UDP-A	Uridin-5'-diphosphat-N-Acetylglucosamin
UDP-G	Uridin-5'-diphosphat-Glucose

H. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAM, D. u. HAMELMANN, H.: Pyrithioxin-Behandlung nach Schädeltraumen. Münch.med.Wschr. 1o6, 1o45-1o47 (1964)

2. AMBROZI, L. u. PRAMER, I.: Zerebrale Funktionsverbesserung durch Pyrithioxin. Wien.med.Wschr. 114, 1o5-1o7 (1964)

3. BECKER, K. u. HOYER, S.: Hirnstoffwechseluntersuchungen unter der Behandlung mit Pyrithioxin. Dtsch. Z. Nervenheilk. 188, 2oo-2o9 (1966)

4. BLECKMANN, K.H.: Erfahrungsbericht über die Anwendung von Pyrithioxin in der Kinderpraxis. Prax. Kinderpsychol. Kinderpsychiat. 14, 316-317 (1965)

5. COPER, H.: Trennung und Charakterisierung derAbbauprodukte von DPN, DPNH und TPN nach enzymatischer Hydrolyse durch Gehirnhomogenate. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. 241, 335-345 (1961)

6. COPER, H., HELGE, J. u. HERKEN, H.: Über die Wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DPN- und TPN-Nucleosidase des Gehirns. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 243, 99-112 (1962)

7. COPER, H.: Der Gehalt an NAD, NADP und Nicotinsäureamid im Gehirn von Ratten nach Einwirkung zentral wirksamer Pharmaka. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 244, 42o-428 (1963)

8. DIEMATH, H.E.: Der Einfluß von Vitamin B_6 und Pyrithioxin (Encephabol^R) auf Tiefenableitungen aus dem limbischen System des Menschen. Verhandl. Dtsch. Ges. Inn. Med. 72. Kongr. 1966, 375-378 (1967)

9. DIEMATH, H.E.: Hirnstereotaktische Untersuchungen über Pyrithioxin (Encephabol^R). Klinische Medizin, 21, 458-462 (1966)

1o. EICHHORN, O.: Die Bedeutung der Gefäßpermeabilität im Gehirn. Wien.klin.Wschr. 68, 237 (1956)

11. EICHHORN, O. u. TATZEL, H.: Neue Wege zur Behandlung hirnorganischer Abbauprozesse. Ärztl. Praxis 15, 1263-1264 (1963)

12. ERBSLÖH, F., KLÄRNER, P. u. BERNSMEIER, A.: Über die Bilanz des cerebralen Zuckerstoffwechsels. Klin. Wschr. 36, 849 (1958)

13. FÜNFGELD, E.W.: Zur Wirkungsweise von Pyrithioxin bei Patienten mit diffusen oder umschriebenen zerebralorganischen Störungen. Med. Klinik 58, 1197-12o1 (1963)

14. FÜNFGELD, E.W.: Neue Wege zur Beeinflussung des cerebralen Stoffwechsels. Arzneimittelforschung 14, 601 (1964)

15. GIBBS, E.L., LENNOX, W.G., NIMS, L.F., a. GIBBS, F.A.: Arterial and Cerebral Venous Blood, Arterial Venous Differences in Man. J. biol.Chem. 144, 325 (1942)

16. GOTTSTEIN, U., BERNSMEIER, A. u. SEDLMEYER, I.: Der Kohlenhydratstoffwechsel des menschlichen Gehirns. I. Unterschungen mit substratspezifischen enzymatischen Methoden bei normaler Hirndurchblutung. Klin. Wschr. 41, 943 (1963)

17. HARTMANN-v.MONAKOW,K.: Pyrithioxin-Behandlung neurologisch-psychiatrischer Krankheitsbilder. Schweiz. Med. Wschr. 94, 1059 (1964)

18. HIMWICH, H.E. a. NAHUM, L. H.: The Respiratory Quotient of the Brain. Amer. J. Physiol. 101, 446 (1932)

19. HIMWICH, H. E.: Brain Metabolism and Cerebral Disorders, S. 14. Williams & Wilkins, Baltimore (1951)

20. HOTOVY, R., ENENKEL, H.J., GILLISSEN, J., JAHN, U., KRAFT,H.G., MÜLLER-CALGAN, H., MÜRMANN, P., SOMMER, S., u. STRULLER, R.: Zur Pharmakologie des Vitamins B_6 und seiner Derivate. 2. Mitteilung: Pyrithioxin. Arzneimittelforschung 14, 26-29 (1964)

21. HUBBARD, R.S. a. ZOLL, J.: Entrance of Intravenously Injected Sucrose into Cerebrospinal Fluid. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 7o, 394 (1949)

22. HURLBERT, R.B., SCHMITZ, H. BRUMM, A.F. a. POTTER, V.R. Nucleotide metabolism. II. Chromatographic separation of acid soluble nucleotides. J.Biol.Chem.2o9, 23-29 (1954)

23. KANIG, K. u. KORANSKY, W.: Zur Identifizierung und Bestimmung der freien Nucleotide des Gehirns. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 241, 484-5o6 (1961)

24. KANIG, K.: Biochemische und pharmakologische Grundlagen der modernen psychiatrischen Pharmakotherapie. Dtsch.Med.J. 12, 517-524 (1961)

25. KANIG, K.: Zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Psychopharmaka. Starnberger Gespräche 1962 Sonderdruck im G. Thieme Verlag

26. KANIG, K.: Der Einfluß zentral wirksamer Substanzen auf den Nucleotid-Stoffwechsel des Gehirns. Habilitationsschrift der Hohen Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin (1963)

27. KANIG, K.: persönliche Mitteilung (1967)

28. KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler 3.Aufl. 1962, Thieme-Verlag

29. KETY, S.S.: The General Metabolism of the Brain in vivo. 2. internat. neurochem. Symp. in Aarhus 1956

30. KLEIN, J.R. a. OLSEN, N.S.: Distribution of Intravenously Injected Glutamate, Lactate, Pyruvate, and Succinate between Blood and Brain. J. biol. Chem. 167, 1 (1947)

31. KÖRNER, W.F. u. NOWAK, H.: Zur Vitamin B_6- und Antivitamin B_6-Wirksamkeit von Pyridoxol-Derivaten unter besonderer Berücksichtigung des Pyrithioxins. Arzneimittelforschung 17, 572-581 (1967)

32. KORANSKY, W.: Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 234, 46-65 (1958)

33. KRAFT, H.-G.: Verkehrstüchtigkeit nach Gebrauch zentraler Stimulantien. Arzneimittelforschung 12, 1071-1074 (1962)

34. LEMMENS, F.: Erfahrungen mit Pyrithioxin bei Migräne. Der Landarzt 41, 1228-1229(1965)

35. LENNOX, W.G.: The Cerebral Circulation. XIV. The Respiratory Quotient of the Brain and of Extremities in Man. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.) 26, 719 (1931)

36. LOEBEL, R.O.: Beiträge zur Atmung und Glykolyse tierischer Gewebe. Biochem. Z. 161, 219 (1925)

37. LUSTIG, B.: Klinische Erfahrungen mit Pyrithioxin in der Psychiatrie. Ärztl.Praxis 15, 1401-1402 (1963)

38. MANDEL, P., a. HARTH, S.: Free nucleotides of the brain in various mammals. J. Neurochem. 8, 116-125 (1961)

39. McILWAIN, H.: Biochemistry and the central nervous system. 3. Aufl., Churchill Ltd., London (1966)

40. MENGES, E.: Erfahrungsbericht über ein dynamisierendes Neurotrophikum (Encephabol). Der Landarzt 39, 608-609(1963)

41. MULDER, A.G., a. CRANDALL, L.A.: The Metabolism of the Brain in the Ketonic State. Amer. J. Physiol. 133, 392 (1941)

42. OPITZ, E.: Energieumsatz des Gehirns in situ unter aeroben und aneoroben Bedingungen. Colloquium Physiol. Chem. Mosbach, 3, 66 (1952)

43. PELTZ, H.D.: Zur Psychopharmakotherapie des hirngeschädigten Kindes mit Encephabol. Med. Welt 43, 2438-2444 (1965)

44. QUADBECK, G., LANDMANN, H.R., SACHSSE, W. u. SCHMIDT, I.: Der Einfluß von Pyrithioxin auf die Blut-Hirnschranke. Med.Exper. 7, 144-154 (1962)

45. QUASTEL, J.H.: Respiration in the Central Nervous System. Physiol.Rev. 19, 135 (1939)

46. ROSENAU, H.: Zentrale Hörprüfungen als Testverfahren für Neuropharmaka. Münch.Med.Wschr. 104, 135 (1962)

47. SCHREIBER, K.G.: Pyrithioxin in der Behandlung Schädel-Hirn-Verletzter. Der Landarzt 41, 1126-1128 (1965)

48. SEILER, S., MÖLLER, H. u. WERNER, G.: Der Einbau von Glucose-Kohlenstoff in die freien Aminosäuren des Mäusegehirns unter dem Einfluß von Pyritinol. Z.physiol.Chem. 348, 675-679 (1967)

49. SEUFERT, W.: Erfahrungen mit Encephabol bei cerebralen Gefäßstörungen. Berliner Medizin 14, 338-339 (1963)

50. SIERRA, G. u. REINOSO-SUAREZ, F.: Die Wirkung von Pyridoxoldisulfid auf das EEG der freibeweglichen Katze. Med.Exper. 9, 84-92 (1963)

51. SOMMER, S.: Die Wirkung einiger zentral-erregender Pharmaka einschließlich des Vitamins B_6 und seiner Derivate auf die Perphenazin-Katalepsie der Ratte. Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. 245, 119 (1963)

52. VODOPIVEC, M.: Über therapeutische Versuche mit Pyrithioxin bei migränösen Störungen. Praxis 54, 1051-1054 (1965)

53. WEGELIN, I. a. MANZOLI, F. A.: Free nucleotides in the chick embryo brain during development. J. Neurochem. 12, 1161 (1967)

54. WORTIS, J., BOWMAN, K.M., GOLDFARB, W., FAZEKAS, J.F. a. HIMWICH, H.E.: Human Brain Metabolism. Normal Values in Certain Clinical States. Amer.J.Psychiat. 97, 552 (1940)

55. WORTIS, J., BOWMAN, K.M., GOLDFARB, W., FAZEKAS, J.F. a. HIMWICH, H.E.: Availibility of Lactic Acid for Brain Oxidations. J. Neurophysiol. 4, 243 (1941)

56. Encephabol(R)-Prospekt, E. Merck, Darmstadt, März 1968

Herrn Prof. Dr. K. KÄNIG danke ich aufs herzlichste für die Überlassung des Themas, für einen Arbeitsplatz in der Abteilung für Neurochemie und für die Förderung der Arbeit durch seinen Rat und seine Hilfe, die er mir jederzeit bereitwillig gewährte.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. H.-H. MEYER für die freundliche Erlaubnis, die Laboratorien und die Bibliothek seiner Klinik zu benutzen.

Fräulein Dr. rer. nat. U. BREYER bin ich zu bestem Dank verpflichtet für hilfreiche Diskussionen und zahlreiche Hinweise.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Neurochemie, Herrn N. RUBLY, Fräulein H. KÜHNLE und Herrn P. JOHANN möchte ich an dieser Stelle herzlich Dank sagen für die freundliche Unterstützung bei den zahlreichen Messungen.

LEBENSLAUF

Am 6. Sept. 1941 wurde ich als Sohn des Schreiners Friedrich Brüstle und seiner Ehefrau Lydia, geb. Steinmann in Bad Teinach geboren.
Am 26. Febr. 1942 fiel mein Vater in Rußland.

Nach dem Besuch der Teinacher Volksschule wurde ich im März 1953 in das Hermann-Hesse-Gymnasium Calw aufgenommen, an dem ich am 28. Februar 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Im Mai 1962 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Saarbrücken und bestand dort im April 1963 das Vorphysikum. Im Wintersemester 1964/65 studierte ich in Göttingen und anschließend wieder an der Medizinischen Fakultät Homburg-Saar, wo ich im März 1966 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Frühjahr 1969 werde ich die ärztliche Prüfung ablegen.

Von Mai 1966 bis März 1968 arbeitete ich experimentell in der Abteilung für Neurochemie der Universitäts-Nervenklinik Homburg.